

Tartu Ülikool
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond
Ökoloogia ja Maateaduste Instituut
Taimeökoloogia õppetool

Siim-Kaarel Sepp

MAAKASUTUSE MÕJU ARBUSKULAARMÜKORIISSETE (AM) SEENTE MITMEKESISUSELE

Magistritöö

Juhendaja: vanemteadur Maarja Öpik

Tartu 2015

Sisukord

Sissejuhatus.....	3
Materjal ja metoodika	6
Proovialad	6
Proovide kogumine	6
Molekulaarsed analüüsid	6
Bioinformaatilised analüüsid	8
Statistilised analüüsid.....	9
Tulemused.....	10
AM seente järjestuste arv.....	10
AM seenekoosluste virtuaaltaksonite arv	14
AM seenekoosluste koosseis	19
Indikaatortaksonid	21
Arutelu	26
AM seente virtuaaltaksonite arv.....	26
AM seenekoosluste koosseis	27
Tänuavaldused	30
Kasutatud kirjandus.....	31
Kokkuvõte	37
Summary	39
Lisad	41
Lihtlitsents.....	3

Sissejuhatus

Hõimkonda *Glomeromycota* (krohmseened) kuuluvate arbuskulaarmükoriisete (AM) seente ja maismaataimedevaheline kooselu esindab kõige laiemalt esinevat sümbioosi maismaal. Erinevatel andmetel moodustavad arbuskulaarset mükoriisat 80-90% maismaataimedest (Smith & Read 2008). Kooselu ajalugu ulatub fossiilse ning molekulaarse tõendusmaterjali põhjal devoni ajastusse 410 mln aastat tagasi; AM seente eoseid on leitud 450 mln aasta vanustest ordoviitsiumi ajastu lademetest (Hart & Klironomos 2003; Willis et al. 2013).

Obligaatsete juuresümbiontidena saavad AM seened kogu oma süsiniku taimedelt. On leitud, et taimed võivad mükoriisaseenele anda kuni 40% fotosünteesi käigus fikseeritud süsinikust (Drigo et al. 2010). Vastutasuks suurendavad seened toitainete (P, N, mikrotoitained) transporti taime, tõstavad taimede põua-, soolsus- ning raskemetallitaluvust ning pakuvad kaitset patogeenide eest (Smith & Read 2008). Lisaks otsesele kasule koloniseeritavale taimele, on arbuskulaarset mükoriisat moodustavatel seentel ka omadus parandada mulla struktuuri, eritades aineid (näiteks glomaliin), mis aitavad moodustada stabiilsematel mullaagregaatidel. Tulemuseks olev suurepooriline mullastruktuur parandab mulla õhuvahetust, veehoidmisvõimet ning vähendab erosiooni (Jeffries et al. 2003).

Ökoloogia üks peamisi eesmärke on mõista kooslustevaheliste liikide koosseisu erinevuse taga seisvaid mehhanisme. Mõjult taimekooslustele on AM seeni pikka aega peetud funktsionaalselt üsna võrdväärseteks, kuid hiljutisemad tööd on näidanud, et erinevused AM seente koosluse koosseisus võivad mõjutada taimekoosluste liigirikkust ja produktiivsust (Helgason et al. 2002; Hart & Klironomos 2003; van der Heijden et al. 2008; Li et al. 2010). AM seeneliik, mis võib üht liiki peremeestaime kasvu toetada, võib teist liiki peremeestaimele olla hoopis negatiivse mõjuga (van der Heijden et al. 1998), mistõttu AM seenekooslused on taimkattemustrite kujunemise mõistmiseks suure tähtsusega (Zobel & Öpik 2014). Erinevused AM seente kooslustes võivad mõjutada lisaks taimekoosluse produktsioonile ning koosseisule ka muid ökosüsteemi jaoks olulisi näitajaid, nagu mulla agregeeritus ning süsiniku- ja lämmastikuvaru mullas (Miller &

Jastrow 2000). Selleks, et mõista paremini rolli, mida AM seened taimkatte kujunemisel mängivad, on vaja informatsiooni AM seente levikust ja mitmekesisusest, samuti teguritest, mis AM seente kooslusi kujundavad (Kivlin et al. 2011; Öpik et al. 2013).

Eelnevalt on uuritud AM seenekoosluste mitmekesisuse ja koosseisu erinevusi taimekoosluste lõikes, seda nii globaalsete meta-uuringute käigus (Öpik et al. 2006; Öpik et al. 2010; Kivlin et al. 2011; Öpik et al. 2013), kui ka lokaalsemal skaalal (Oehl et al. 2003; Dumbrell et al. 2010; Oehl et al. 2010). Enamik töid, mis uurivad maakasutuse mõju AM seenekooslustele, on aga selgelt seotud just põllumajandusega, kus mitmekesisuse ja koosseisu erinevusi AM seenekooslustes seletatakse näiteks mulla häiringuga (Mirás-Avalos et al. 2011; Brito et al. 2012), väetamisega ja põldude monokultuursusega (Oehl et al. 2003). Samas on mittepõllumajanduslikele aladele keskenduvaid töid seni tehtud suhteliselt vähem. Näiteks Davison et al. (2011) leidsid, noorest ja vanast metsast pärit AM seenekooslused on erinevad ning Uibopuu et al. (2012) näitasid, et erinevatest kooslusetüüpidest pärit AM seenekooslustel on taimede kasvule erinev mõju.

AM seened võivad erineda lisaks muudele funktsionaalsetele omadustele ka elukäigutunnuste poolest, näiteks peamise levisetüübi poolest (López-García et al. 2014). AM seened võivad levistena kasutada eoseid, juurtevälisest mütseeli või mükoriisid juuri. Varasemates töödes on oletatud, et AM seente taksonoomilised rühmad võivad oma põhilise levisetüübi poolest erineda (Chagnon et al. 2013), mistõttu ka mullas ning juurtes asuvad AM seenekooslused võiksid koosseisult olla erinevad. Juurte ja mulla AM seenekoosluste erinevusi on uuritud ka eelnevates töödes ning leitud on, et vastavad AM seenekooslused erinevad, kuid mullas ja juurtes esinevate AM taksonite arv on umbkaudu sama (Saks et al. 2014; Varela-Cervero et al. 2015).

Käesolevas töös uuritakse AM seenekooslusi maakasutuselt erinevates kooslusetüüpides nagu salumets, puisniit, alvar ja ka õuemuru. On võimalik, et AM seenekooslused võivad taimeliigiti erineda (Jansa et al. 2008; Dumbrell et al. 2010; Öpik et al. 2010). Selleks, et eemaldada võimalik peremeestaimeliigi mõju AM seente kooslusele, kasutati töös vaid ühe taimeliigi juuri ning sellele taimele kättesaadavat osa mulla AM seente kooslusest (taimeisendi risosfääri mulda). Lisaks koosluste kitsamale eristamisele jagati kooslused ka avatud ning metsasteks kooslusteks (avatud: alvar, kinnikasvanud alvar, õuemuru;

metsased: salumets, salumetsa raiesmik, puisniit) ning kvaliteetseteks ning mittekvaliteetseteks (kontrastsete paaridena: alvar – kinnikasvanud alvar, salumets – salumetsa raiesmik, puisniit – õuemuru). Salumetsa raiesmik liigitati metsaste koosluste hulka, kuna võiks eeldada, et seal pikaajaliselt väljakujunenud AM seenekoslused on seda teinud metsastes tingimustes). Kinnikasvanud alvarit käsitletakse avatud kooslusena seetõttu, et tegemist oli arbuskulaarmükoriisse kadaka poolt kinnikasvanud alvaritega, kus ektomükoriisset mändi veel oluliselt ei esinenud.

Antud töös sooviti leida vastused järgmistele küsimustele:

- (1) kas AM seente liigirikkus sõltub antud prooviala kooslusetüübist;
- (2) kas ja kuidas erinevad kooslusetüüpide AM seenekoosluste koosseisud;
- (3) kas AM seente mitmekesisus ja koosluse koosseis erineb juurtes ja juuri ümbritsevas mullas, kusjuures eeldatavasti võiks mulla AM seente mitmekesisus olla suurem (Saks et al. 2014)?

Materjal ja metoodika

Töö autori poolt teostati välitööde käigus proovide kogumine; koostöös teiste töörühma liikmetega DNA eraldamine proovidest; töörühmas välja töötatud metoodikat järgides bioinformaatiliste analüüside läbiviimine; andmete statistiline töötlus töörühma liikmete juhendamisel.

Proovialad

Uurimusse kaasati kuus taimekoosluse tüübilt ja avatuselt erinevat kasvukohta Eestist. Kooslusetüübid liigitusid järgnevalt: alvar, kinnikasvanud alvar (suuremas osas kinni kasvanud kadakaga, mändi üksikult ja väikesed taimed), puisniit, õuemuru, salumets ja salumetsa raiesmik (raie teostatud hinnanguliselt kolm aastat tagasi). Iga kooslusetüübi kohta oli uurimuses kaks erinevat prooviala (Lisa 1).

Proovide kogumine

Igalt proovialalt korjati 10 juureproovi liigi *Prunella vulgaris* (harilik käbihein) juurtest ning 10 mullaproovi juureproove ümbritsevast risosfäärast. Juureproov sisaldas endas ühe taimeindiviidi kõiki mullast eraldada õnnestunud juuri. Mullaproovid võeti kahes 5g korduses, üritades mõistlikkuse piires vältida juurte sattumist mullaproovi hulka. Proovid korjati 10 x 10 m prooviruudu piires 2014. aasta juulis ja augustis. Nii juure- kui mullaproovid kuivatati silikageeliga ning säilitati õhukindlates kottides toatemperatuuril kuni edasiste analüüsideni. Molekulaarsetesse analüüsidesse kaasati igalt proovialalt 5 mullaproovi ning 5 juureproovi (sekveneerimisel *Glomeromycota* sekventse andnud proovid alade kaupa: Lisa 1).

Molekulaarsed analüüsid

DNA eraldamine toimus kuivatatud proovidest. Juureproovidest DNA eraldamiseks kasutati PowerSoil®-htp 96 Well Soil DNA Isolation Kit süsteemi (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) muudatustega, mida on kirjeldatud Saks et al. (2014) ning 5-70 mg kuivatatud juuri proovi kohta. Mullaproovidest DNA eraldamiseks kasutati

PowerMax® Soil DNA Isolation Kit süsteemi (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) ning 5 g kuivkaaluga mullaproovi.

Hõimkonna *Glomeromycota* sekventsids amplifitseeriti eraldatud DNA ekstraktidest, kasutades SSU rRNA geeni praimereid NS31 ja AML2 (Simon et al. 1992; Lee et al. 2008), mis olid vastavalt seotud 454-sekveneerimise adapteritega A ja B, kasutades Öpik et al. (2013) 454 sekveneerimise protokoll. SSU rRNA geen valiti seetõttu, et suurim andmestik arbuskulaarmükoriisete seente looduslikust mitmekesisusest on kirjeldatud seda geenoomipiirkonda kasutades (Öpik et al. 2014). NS31/AML2 praimeripaar amplifitseerib umbes 560 aluspaari pikkuse fragmendi SSU rDNA-st enamiku hõimkonna *Glomeromycota* esindajate puhul. Selleks, et eristada erinevatest proovidest pärit sekventse, kasutati 8 aluspaari pikkuseid triipkoode (Parameswaran et al. 2007), mis lisati adapter A praimeri ning NS31 praimeri sekventsidesse ning adapter B praimeri ning AML2 praimeri sekventsidesse vahele. Kasutati kaheastmelist PCR-i: esimeses PCR reaktsioonis olid PCR praimerite külge lisatud triipkoodid ja osa 454 sekveneerimise adapteritest A või B; teises PCR reaktsioonis kasutati praimeritena 454 adaptereid A ja B. See PCR viib lõpule amplikonile 454 adapter + triipkood + PCR praimer konstrukti lisamise. Pärilpidine praimer esimeses PCR reaktsioonis oli: 5'- GTCTCCGACTCAG (NNNNNNNN) TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC -3'; ja äraspidine praimer: 5' TTGGCAGTCTCAG (NNNNNNNN) GAACCCAAACACTTTGGTTTCC -3', kusjuures A ja B praimerid on alla joonitud, triipkoodi tähistavad sulgudes olevad N-tähed ja spetsiifilised praimerid NS31 ja AML2 on kursiivis. Esimese PCR reaktsiooni kümnekordset lahjendust kasutati teises PCR reaktsioonis praimeritega A (5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-3') ja B (5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG-3'). Reaktsioonisegu sisaldas 5 µl Qiagen HotStarTaq Master Mix (Qiagen GmbH, Saksamaa), 0,2 µl kumbagi praimerit ja 1 µl DNA nukleotiidide segu'i, kokku 10 µl. Negatiivsed kontrollid teostati ilma nukleotiidide seguta. PCR reaktsioone jooksutati 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) termotsükleril järgmistel tingimustel: (1) 95°C 15 minutit; (2) viis tsüklit 42°C 30 sekundit, 72°C 90 sekundit, 92°C 45 sekundit; (3) 35 tsüklit (esimene PCR) või 20 tsüklit (teine PCR) 65°C 30 sekundit, 72°C 90 sekundit, 92°C 45 sekundit; (4) 65°C 30 sekundit ja 72°C 10 minutit. PCR produktid eraldati elektroforeesiga läbi 1,5% agarosgeeni 0,5 x TBE-s ning PCR produktid puhastati geelist kasutades Qiagen QIAquick Gel Extraction komplekti (Qiagen GmbH,

Saksamaa) ja Agencourt® AMPure® XP PCR puhastussüsteemi (Agencourt Bioscience Co., Beverly, MA, USA). DNA kvantifitseeriti, kasutades Qubit® 212 fluoromeetrit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

DNA segu sekveneeriti Genome Sequencer FLX süsteemil, kasutades Titanium Series reagente (Roche Applied Science).

Bioinformaatilised analüüsid

Sekventsids kaasati edasistesse analüüsidesse, kui nad sisaldasid õiget triipkoodi ja edaspidise praimerijärjestust ning olid (ilma triipkoodi ja praimerijärjestusest) vähemalt 170 aluspaari pikad. Kimäärsed järjestused tuvastati ja eemaldati andmetest kasutades UCHIME programmi vaikimisi sätetega (Edgar et al. 2011) ja referentsandmebaasiks oli MaarjAM (Öpik et al. 2010). Pärast triipkoodi- ja praimerijärjestuste mahalõikamist kasutati hõimkonna *Glomeromycota* avaldatud SSU rRNA geeni järjestuste andmebaasi MaarjAM sekventsiledele taksonoomilise kuuluvuse määramiseks (andmebaasi seisuga 04.02.2015). Kasutati *open-reference* OTU moodustamist (Bik et al. 2012): esmalt teostati BLAST (Altschul et al. 1990) otsing MaarjAM andmebaasi vastu (kriteeriumiteks sekventsilede sarnasus vähemalt 97%, joonduse pikkus vähemalt 95% järjestuste pikkusest ja BLAST'i e-väärtus < 1e-50). Sekventsids, mis MaarjAM andmebaasi vastu nendele kriteeriumitele vastavat vastet ei saanud, eraldati ning teostati nendega BLAST otsing INSD andmebaasi (seisuga 13.03.2015) vastu. Saadud vastetest võeti välja INSD taksonoomia järgi hõimkonda *Glomeromycota* kuuluvad järjestused, klasterdati programmiga BLASTClust (Dondoshansky & Wolf 2000) ning teostati vaikimisi sätetega lähinaabri meetodil fülogeneetiline analüüs programmiga TOPALi v2 (Milne et al. 2009), selgitamaks välja MaarjAM andmebaasis esindamata hõimkonna *Glomeromycota* virtuaaltaksonid. Moodustati 12 uut virtuaaltaksonit, kusjuures igale uuele virtuaaltaksonile määrati tüüpjärjestus. Uute virtuaaltaksonite tüüpjärjestustele lisati juurde MaarjAM andmebaasis esindatud virtuaaltaksonite tüüpjärjestused ning loodi uus kombineeritud referentsandmebaas. Uue andmebaasi vastu teostati uus BLAST otsing ülalkirjeldatud parameetritega.

Statistilised analüüsid

Statistilised analüüsid teostati programmiga R 3.0.1 (R Core Team 2013). Analüüsidesid jäeti välja vaid ühe sekventsina esinenud virtuaaltaksonid.

Selleks, et testida proovipõhise virtuaaltaksoni arvu ja järjestuste arvu erinevusi erinevates kooslusetüüpides ja proovitüüpides, kasutati üldistatud lineaarseid mudeleid ja ANOVAt. Lineaarsetes mudelites käsitleti kooslusetüüpi fikseeritud faktorina ning prooviaala juhusliku faktorina. Post-hoc võrdlustes kasutati paarikaupa t-testi (käsk `pairwise.t.test` programmis R) Bonferroni korrigeerimisega ning Tukey testi (käsk `TukeyHSD` programmis R).

AM seente koosluse koosseisu analüüsimiseks kasutati kvantitatiivset andmestikku, kus virtuaaltaksonite ohtrust proovis väljendatakse antud virtuaaltaksoni sekventsides arvu suhtena antud proovi kogu sekventsides arvu (suhteline ohtrus). Koosluste sarnasuse mõõduna kasutati Bray-Curtise statistikut. Koosluste koosseisu varieeruvuse visualiseerimiseks kasutati korrespondentsanalüüsi [funktsioon `cca` R paketi `vegan` (Oksanen et al. 2015)].

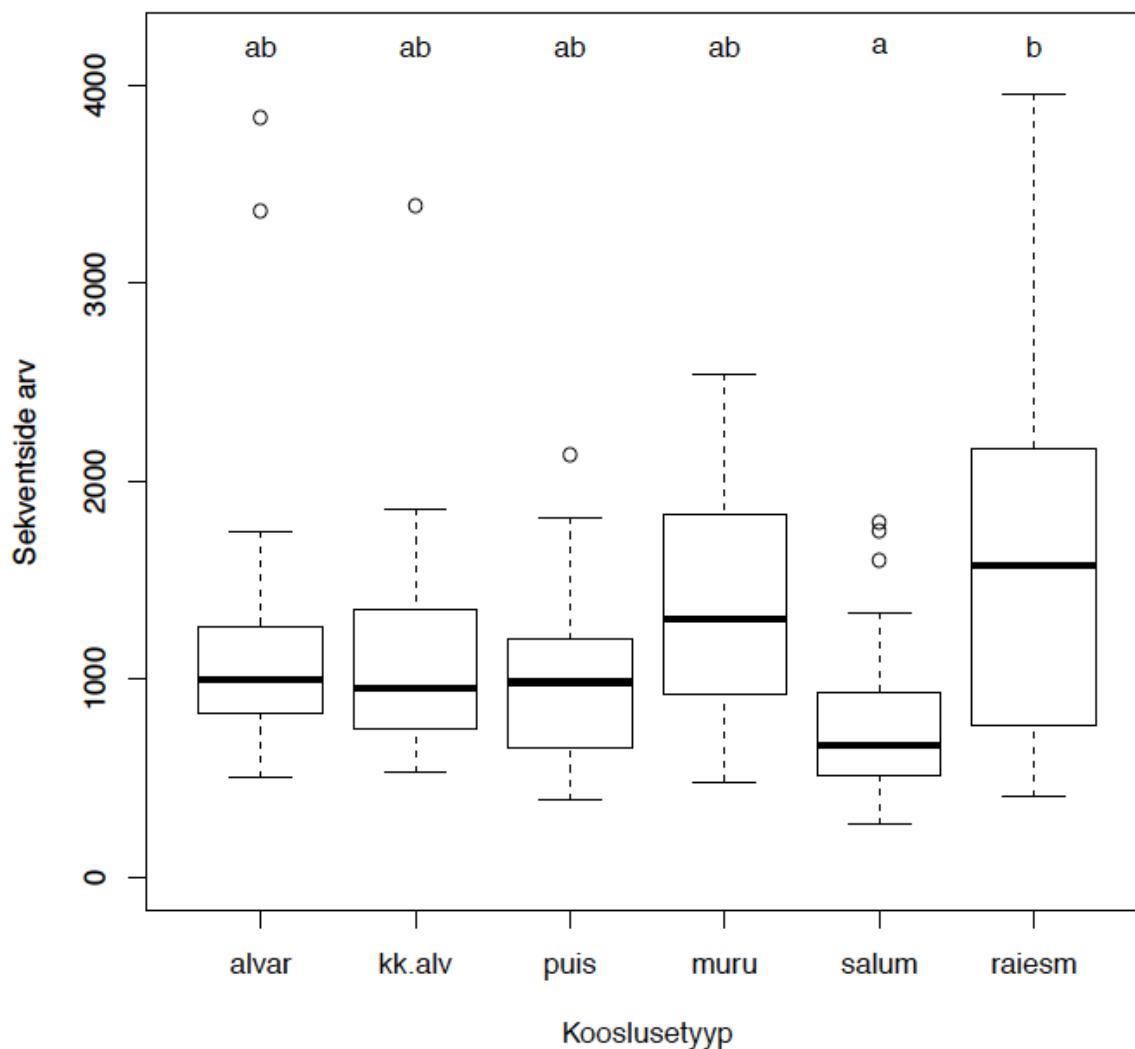
Selleks, et tuvastada AM seente taksonid, mis on eelistatult seotud mingite kindlate kooslusetüüpidega antud uurimuses, kasutati indikaatorliikide analüüsi (Dufrêne & Legendre 1997), mida teostati funktsiooniga `indval()` R paketi `labdsv` (Roberts 2013). Indikaatorina loeti ainult taksoneid, mille indikaatorväärtus oli vähemalt 0,25 (Moora et al. 2014 järgi).

Tulemused

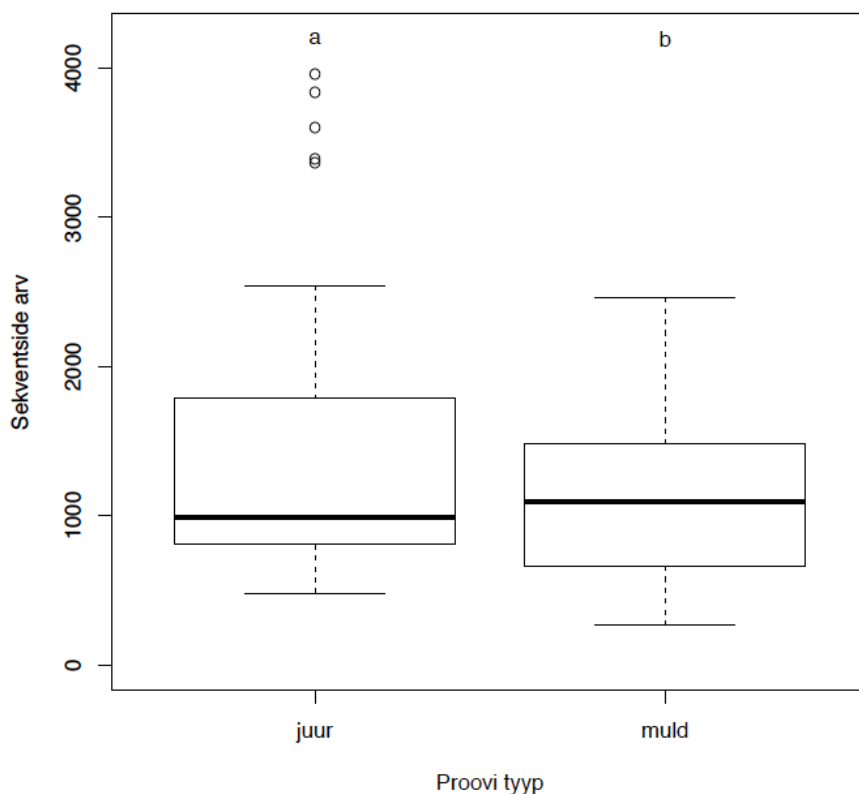
Analüüside tulemusena saadi 103 proovist kokku 148 AM seente virtuaaltaksonit (VT) 127 720 sekventsina, millest pärast ainult ühe sekventsina esinenud virtuaaltaksonite eemaldamist jäi järele 127 VT 103 proovist (~85% algsest VTde arvust). Virtuaaltaksonid jagunesid sugukondadesse järgmiselt: 79 *Glomeraceae*, 11 *Archaeosporaceae*, 10 *Diversisporaceae*, 9 *Acaulosporaceae*, 6 *Claroideoglomeraceae*, 6 *Paraglomeraceae*, 4 *Gigasporaceae*, 1 *Pacisporaceae*, 1 *Ambisporaceae* (MaarjAM andmebaasi nomenklatuuri järgi).

AM seente järjestuste arv

Keskmine AM seente sekventsiaide arv proovi kohta sõltus kooslusetüübist (ANOVA, $F_{5,91} = 2,7$, $p < 0,03$, joonis 1). Omavahel erinesid salumets ja salumetsa raiesmik, kus salumetsaproovides oli oluliselt vähem AM seente järjestusi kui salumetsa raiesmikul (Student'i paarikaupa t , $p < 0,02$). Samuti oli proovitüüpide võrdluses mullaproovide AM seente järjestuste arv oluliselt kõrgem (ANOVA, $F_{1,91} = 4,5$; $p < 0,04$, joonis 2). Kooslusetüübi ja proovitüübi vahelist interaktsiooni ei tuvastatud.

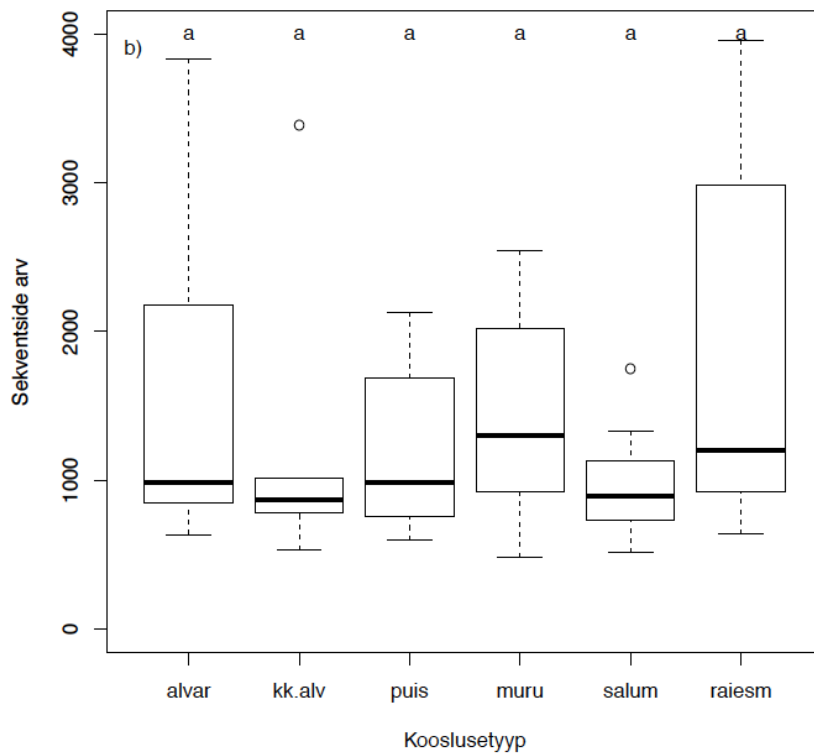
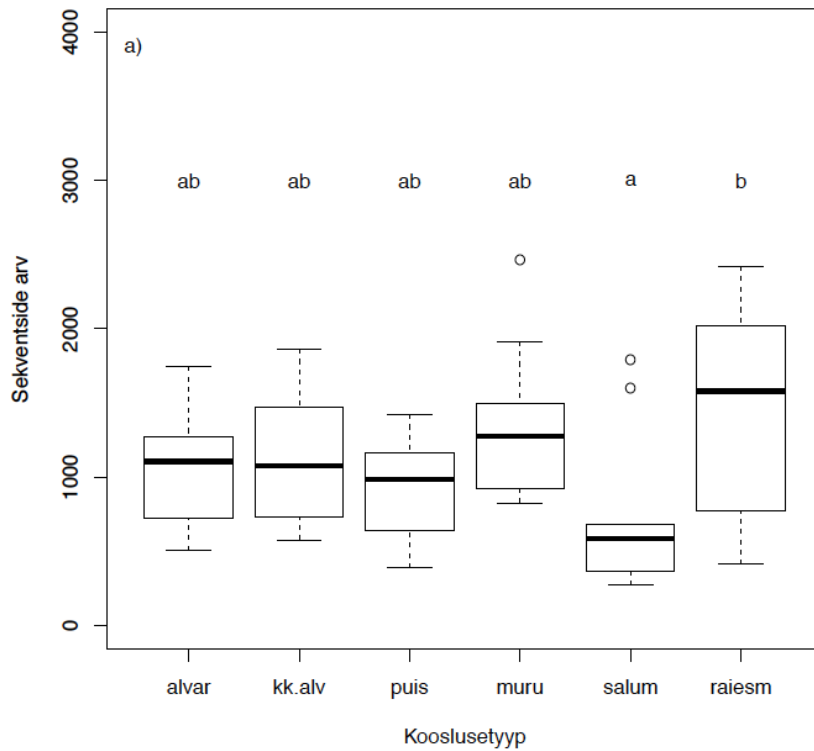


Joonis 1. Kooslusetüübi mõju AM seente järjestuste arvule proovi kohta. Rasvased jooned tähistavad mediaane, kastid kvartiile ning vurrud valimi usaldatavaid miinimum- ja maksimumväärtusi; punktid tähistavad erindeid. Tähed tähistavad kooslusetüüpide vahelisi erinevusi. X-telje lühendid tähistavad kooslusetüüpe järgmiselt: alvar – alvar; kk.alv – kinnikasvanud alvar; puis – puisniit; muru – õuemuru; salum – salumets; raiesm – salumetsa raiesmik.



Joonis 2. AM seente järjestuste arv proovi kohta proovi tüübist sõltuvalt. Rasvased jooned tähistavad mediaane, kastid kvartiile ning vurrud valimi usaldatavaid miinimum- ja maksimumväärtusi; punktid tähistavad erindeid.

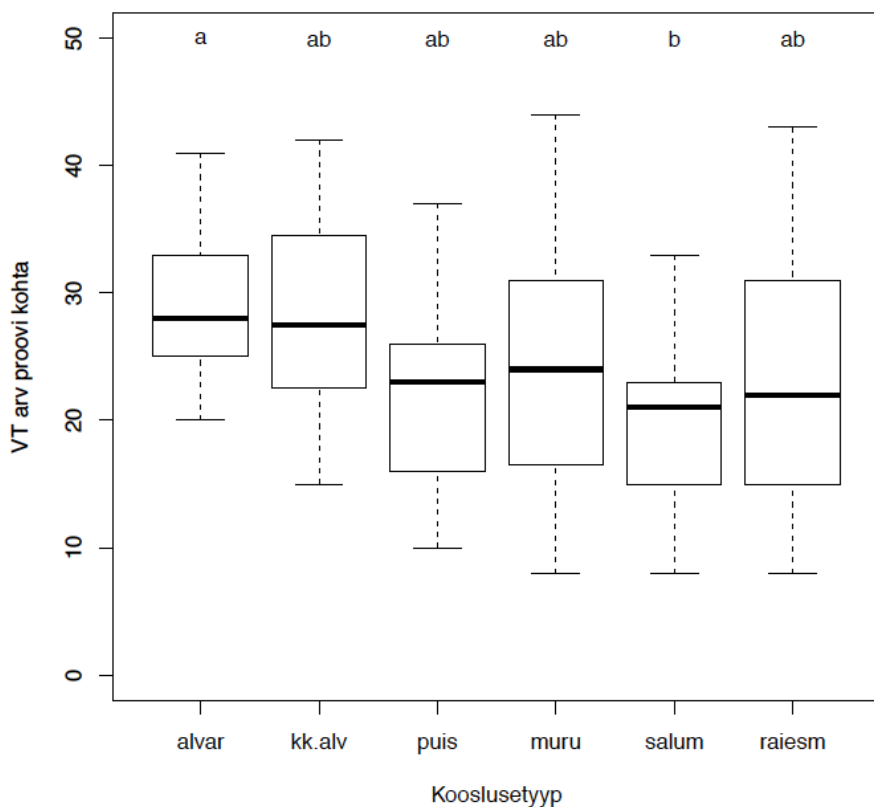
Analüüsidest ainult mullaproove, esines kooslusetüübil samuti oluline mõju VT järjestuste arvule proovi kohta (ANOVA, $F_{5,54} = 3,1$; $p < 0,02$, joonis 3a), kusjuures oluline erinevus oli omavahel võrreldes taaskord vaid salumetsal (kõrgem proovipõhine järjestuste arv) ja salumetsa raiesmikul (Student'i paarikaupa t , $p < 0,03$). Ainult juureproove vaadeldes ei olnud kooslusetüübil VT järjestuste arvule statistiliselt olulist mõju (joonis 3b).



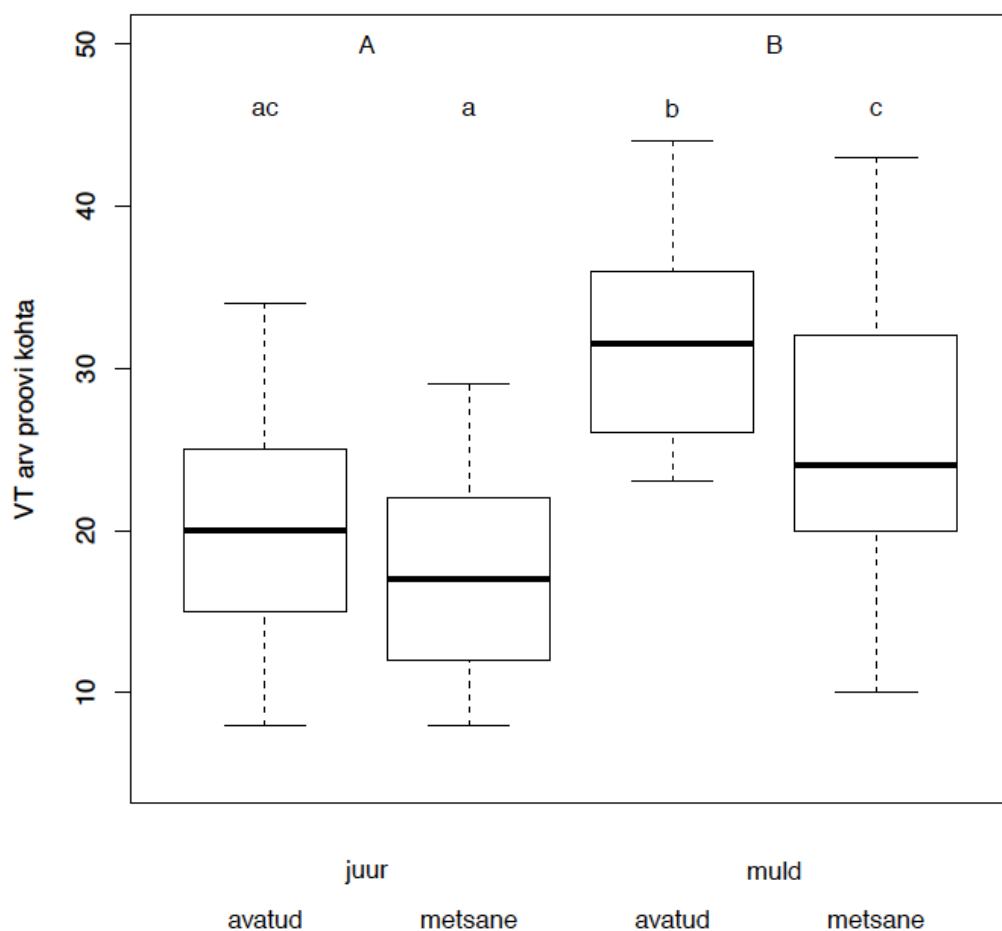
Joonis 3. AM seente järjestuste arv proovi kohta kooslusetüüpide kaupa (a) mullaproovides ja (b) juureproovides. Rasvased jooned tähistavad mediaane, kastid kvartiile ning vurrud valimi usaldatavaid miinimum- ja maksimumväärtusi; punktid tähistavad erindeid. Tähed tähistavad kooslusetüüpide vahelisi erinevusi. X-telje lühendid tähistavad kooslusetüüpe järgmiselt: alvar – alvar; kk.alv – kinnikasvanud alvar; puis – puisniit; muru – õuemuru; salum – salumets; raiesm – salumetsa raiesmik.

AM seenekoosluste virtuaaltaksonite arv

AM seente keskmine virtuaaltaksonite arv proovi kohta erines kooslusetüüpide vahel oluliselt (ANOVA, $F_{5,91} = 4,4$, $p < 0,01$). Paarikaupa võrdluses oli keskmine VT arv proovi kohta salumetsas oluliselt madalam kui alvaril (keskmiselt vastavalt 20 ja 29 VT proovi kohta) (Student'i paarikaupa t , $p < 0,03$, joonis 4). Samuti olenes keskmine VT arv proovi kohta proovi tüübist, mullaproovide keskmine VT arv proovi kohta oli oluliselt kõrgem (ANOVA, $F_{1,91} = 49,1$, $p < 0,001$, joonis 5), olles mullaproovides keskmiselt 28 ja juureproovides keskmiselt 19 VT proovi kohta. Samuti sõltus VT arv proovi kohta oluliselt sellest, kas tegemist oli metsase (salumets, raiesmik, puisniit) või avatud (alvar, kinnikasvanud alvar, õuemuru) kooslusega (ANOVA, $F_{1,99} = 12,2$; $p < 0,001$, joonis 5). Kooslusetüübi ja proovitüübi vahelist interaktsiooni ei esinenud.

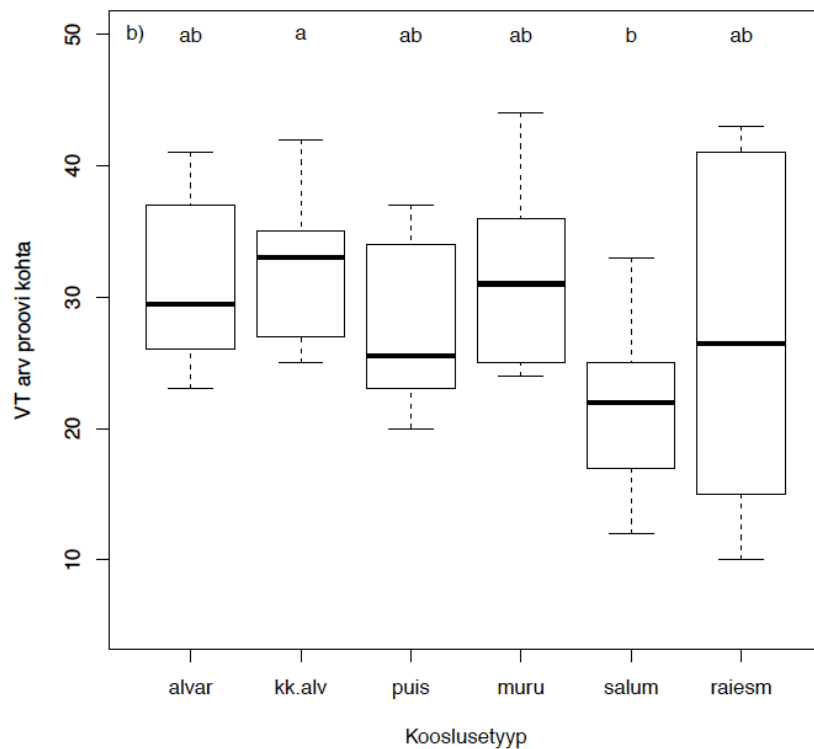
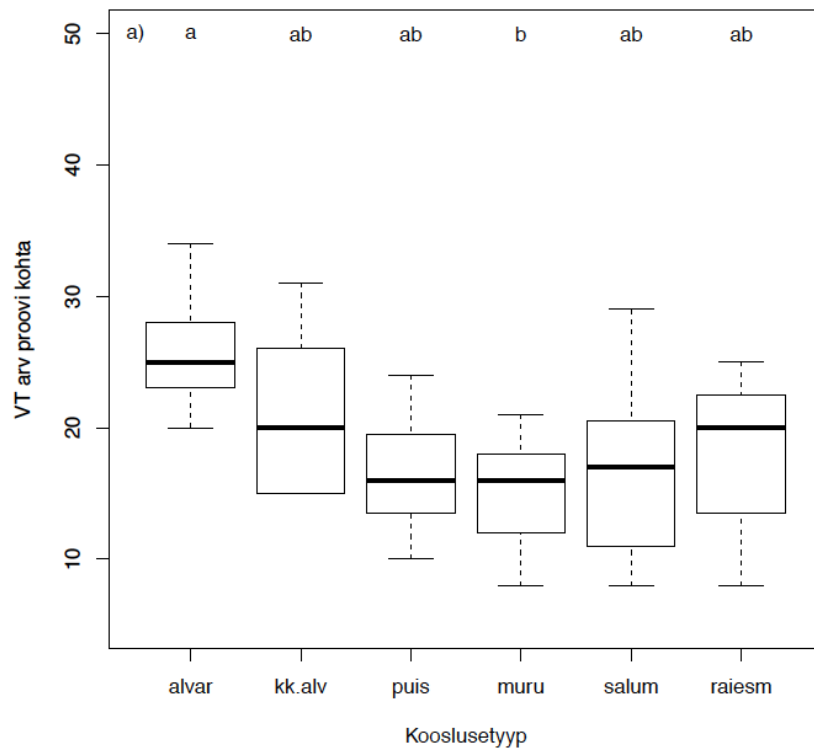


Joonis 4. AM seente virtuaaltaksonite keskmine arv proovi kohta kasvukohtade kaupa üle kõigi proovide. Rasvased jooned tähistavad mediaane, kastid kvartiile ning vurrud valimi usaldatavaid miinimum- ja maksimumväärtusi. Tähed tähistavad kooslusetüüpide vahelisi erinevusi. X-telje lühendid tähistavad kooslusetüüpe järgmiselt: alvar – alvar; kk.alv – kinnikasvanud alvar; puis – puisniit; muru – õuemuru; salum – salumets; raiesm – salumetsa raiesmik.



Joonis 5. AM seente virtuaaltaksonite keskmine arv proovi kohta vastavalt kas mullaproovides või juureproovides ning avatud või metsastes kasvukohtades. Suurtähed tähistavad mulla- ja juureproovide erinevust, väiketähed tähistavad kõikide faktorikombinatsioonide erinevusi. Rasvased jooned tähistavad mediaane, kastid kvartiile ning vurrud valimi usaldatavaid miinimum- ja maksimumväärtusi.

Vaadates ainult juureproovide keskmist VT arvu proovi kohta, esines koosluse tüübi mõju (ANOVA, $F_{5,37} = 3,5$, $p < 0,02$, joonis 6), kusjuures paarikaupa võrdlustes oli õuemuru juureproovide keskmine VT arv proovi kohta oluliselt madalam alvari VT arvust proovi kohta, vastavalt 15 ja 26 VT proovi kohta (Student'i paarikaupa t , $p < 0,02$).



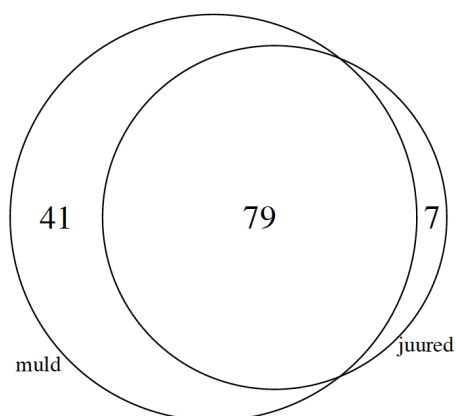
Joonis 6. AM seente virtuaaltaksonite keskmine arv proovi kohta kooslusetüübist sõltuvalt (a) juureproovides või (b) mullaproovides. Rasvased jooned tähistavad mediaane, kastid kvartiile ning vurrud valimi usaldatavaid miinimum- ja maksimumväärtusi. Tähed tähistavad kooslusetüüpide vahelisi erinevusi. X-telje lühendid tähistavad kooslusetüüpe järgmiselt: alvar – alvar; kk.alv – kinnikasvanud alvar; puis – puisniit; muru – õuemuru; salum – salumets; raiesm – salumetsa raiesmik.

Mullaproovide puhul oli kooslusetüübil VT arvule proovi kohta samuti oluline mõju (ANOVA, $F_{5,54} = 2,8$, $p < 0,03$, joonis 6), paarikaupa võrreldes nähtus trend, et salumetsa proovipõhine VT arv mullaproovides oli madalam kui kinnikasvanud alvaril, vastavalt keskmiselt 22 ja 31 VT proovi kohta (Student'i paarikaupa t , $p = 0,050$).

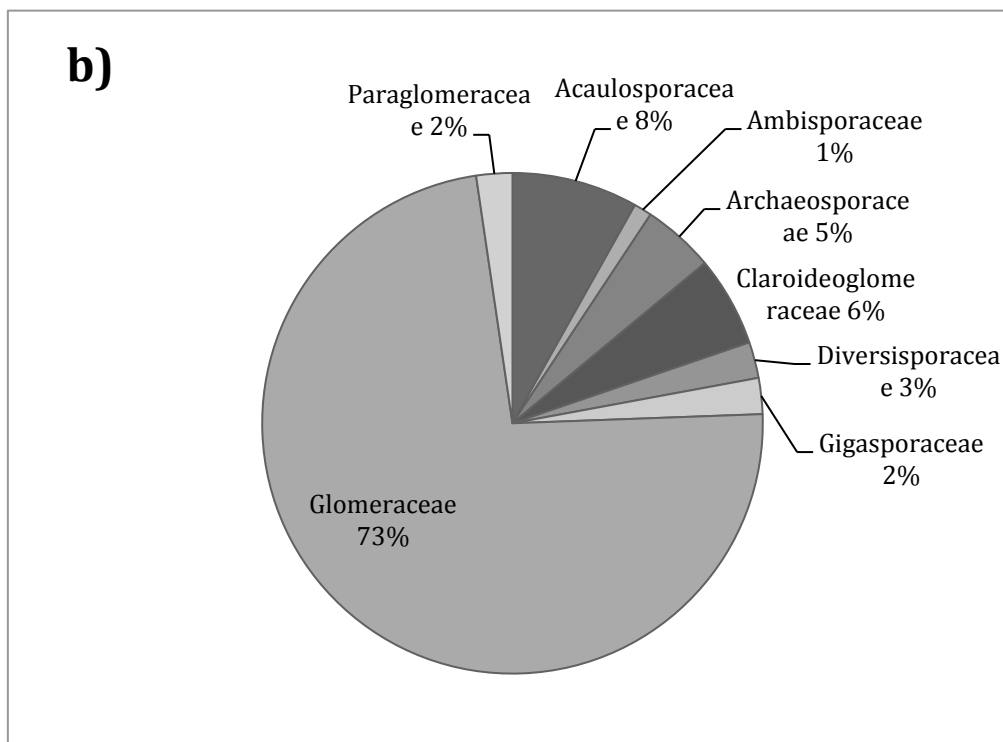
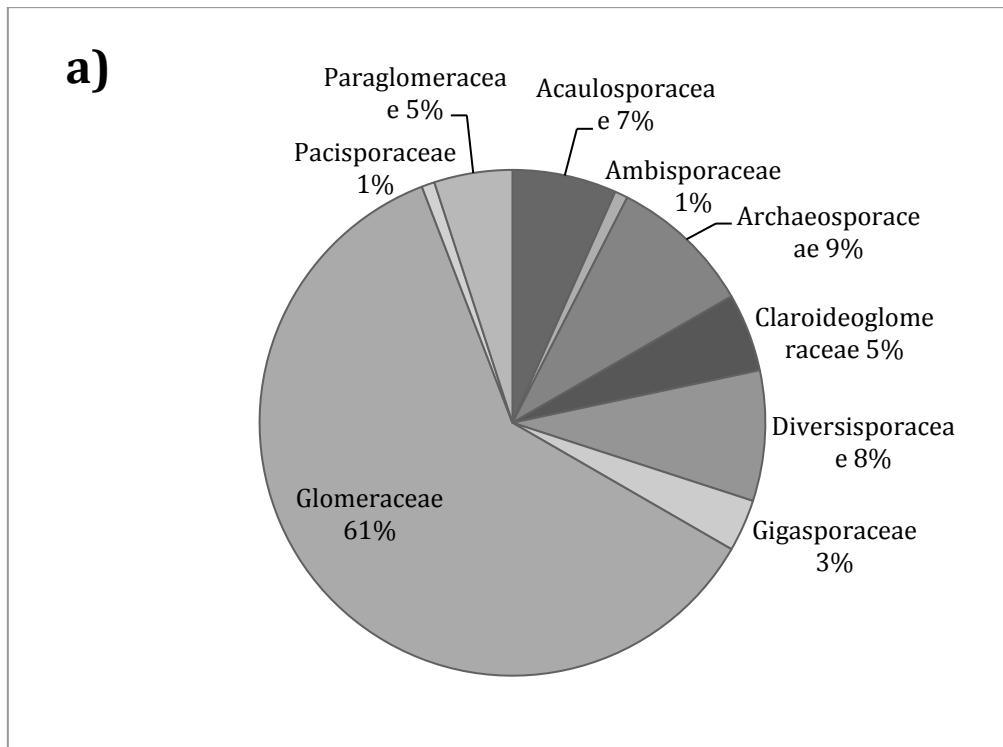
Enim virtuaaltaksoneid kõikide proovide peale kokku leiti õuemuru kooslusetüübist (84) ja vähim kinnikasvanud alvarilt (56) (tabel 1). Proovialade kaupa võrdluses leiti samuti enim virtuaaltaksoneid õuemuru proovialadelt, vastavalt 57 ja 58 VT (lisa 1). Juureproovidest leiti kokku 86 virtuaaltaksonit, millest ainult juurtes esines 7; mullaproovidest leiti 120 virtuaaltaksonit, millest ainult mullas esines 41 (joonis 7). Mullaproovide arvukaimaks sugukonnaks oli *Glomeraceae* (61%), sama sugukond oli arvukaim ka juureproovides, aga rohkemal määral (73%) (joonis 8).

Tabel 1. Virtuaaltaksonite (VT) arv kooslusetüüpide lõikes.

Kooslusetüüp	VT arv kokku	VT juurtes	VT mullas
Alvar	62	40	58
Kinnikasvanud alvar	56	35	54
Puisniit	61	33	58
Õuemuru	84	41	83
Raiesmik	64	39	60
Salumets	63	41	56



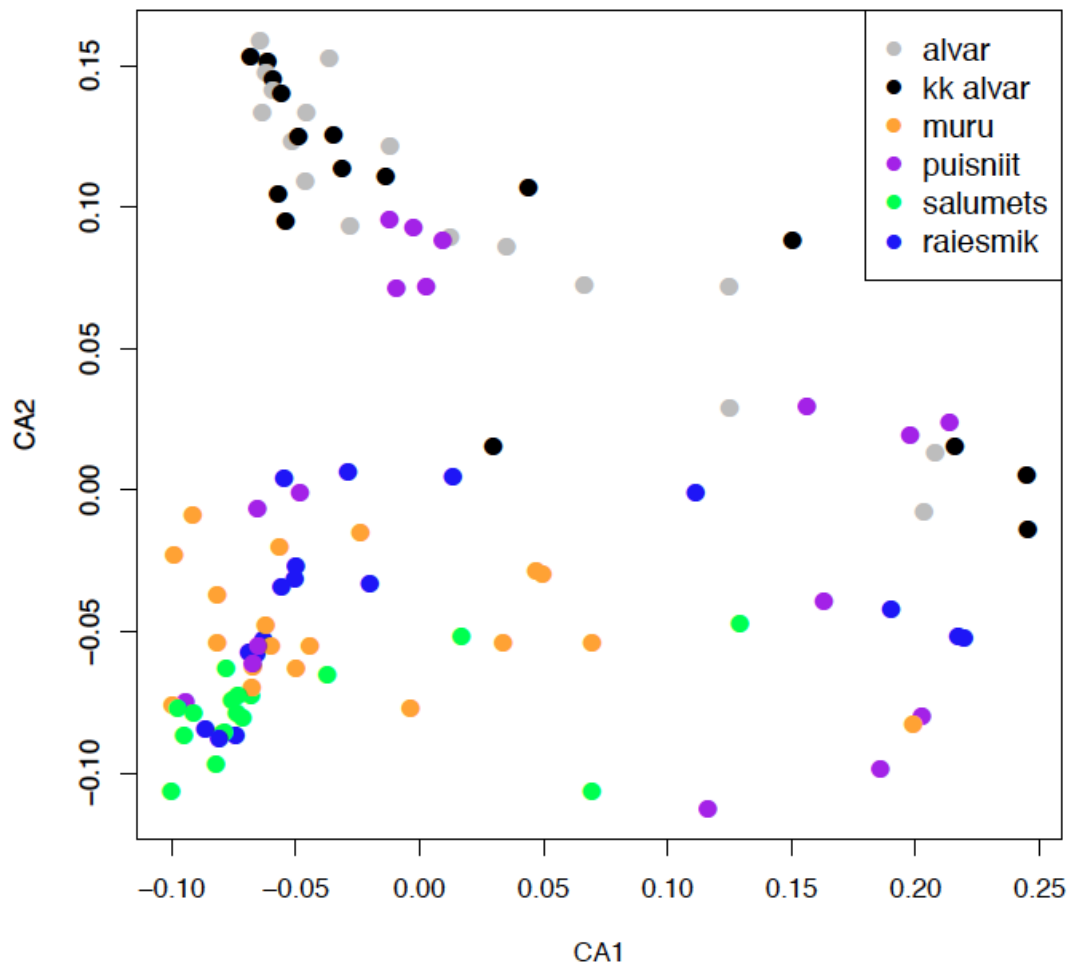
Joonis 7. Mullaproovidest (vasakul), juureproovidest (paremal) ning nii mulla- kui juureproovidest (keskel) leitud virtuaaltaksonite (VT) arv.



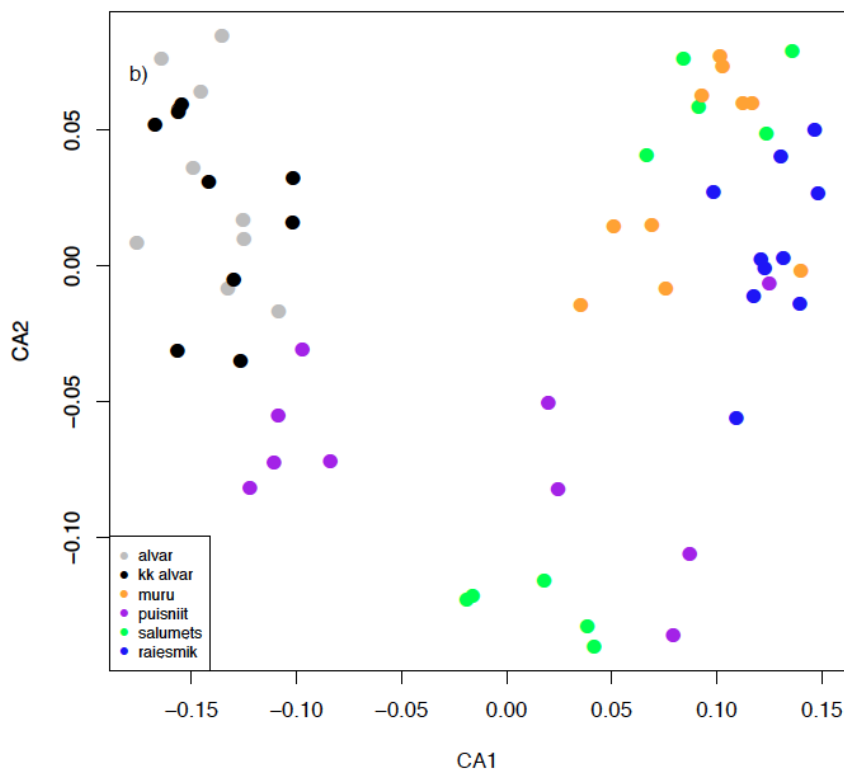
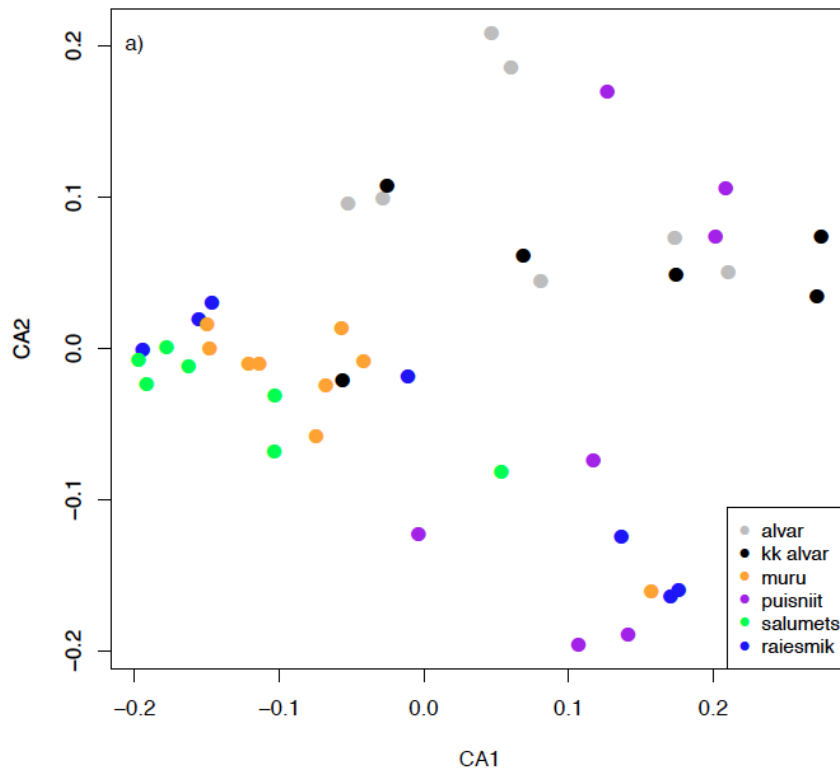
Joonis 8. (a) Mulla- ja (b) juureproovide virtuaaltaksonite (VT) arvu jaotus sugukondade kaupa MaarjAM andmebaasi nomenklatuuri järgi.

AM seenekoosluste koosseis

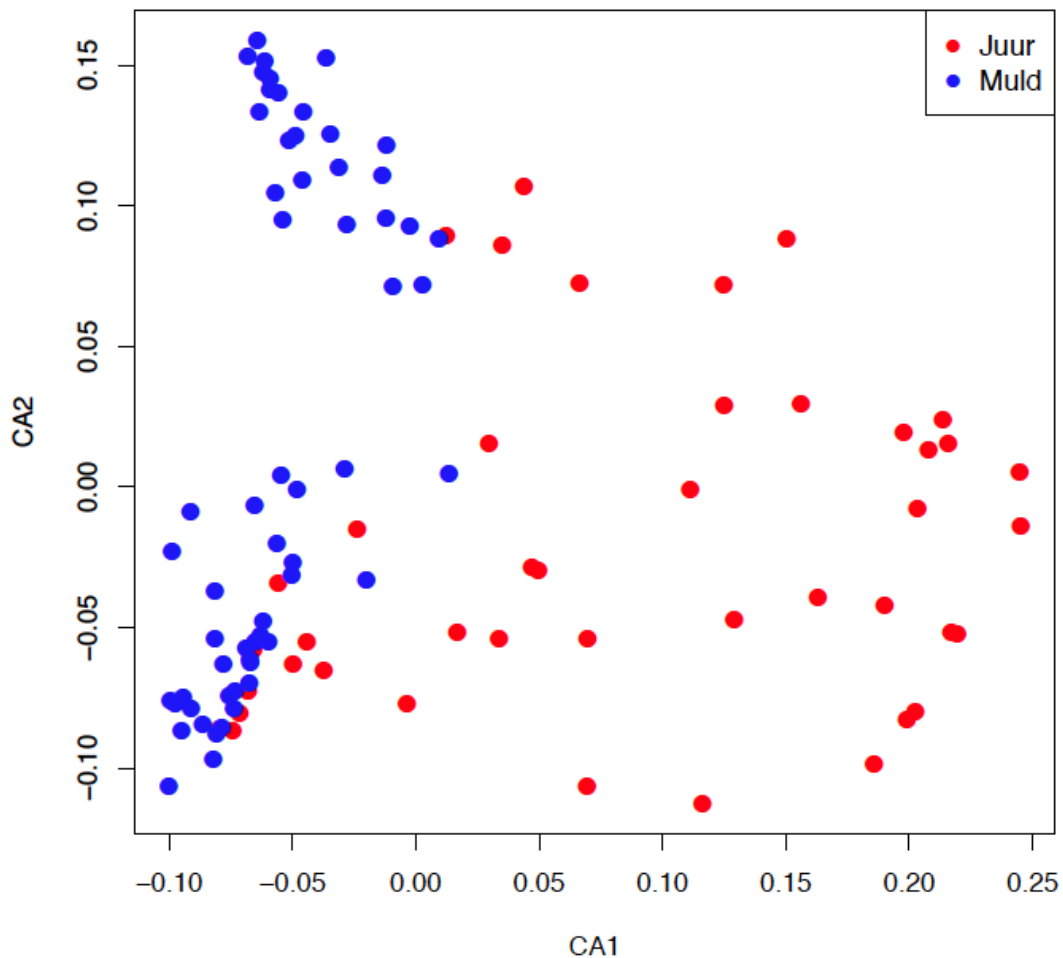
Korrespondentsanalüüsi (CA) käigus ilmneseid erinevused kooslusetüüpide AM seenekoosluste koosseisudes. Kõiki proove vaadates grupeerusid alvaritelt ja kinnikasvanud alvaritelt pärit proovid, mis eristusid ordinatsioonil salumetsa, salumetsa raiesmike ning õuemuru proovidest, kusjuures salumetsa ja salumetsa raiesmike kooslused grupeerusid omavahel (joonis 9). Samagugune muster nähtus ka ainult juurtest ja ainult mullast pärit AM seenekoosluste puhul (joonis 10). Selged erinevused AM seenekoosluste koosseisus ilmneseid ka juureproovide ja mullaproovide vahel, mis ordinatsioonil eristusid (joonis 11).



Joonis 9. Korrespondentsanalüüs AM seenekoosluste koosseisudest kooslusetüübi kaupa. Iga punkt tähistab ühte proovi. Värvid tähistavad kooslusetüüpe: hall – alvar; must – kinnikasvanud alvar; oranž – õuemuru; lilla – puisniit; roheline – salumets; sinine – salumetsa raiesmik.



Joonis 10. Korrespondentsanalüüsid eraldi juureproovide (a) ja eraldi mullaproovide (b) AM seenekoosluste koosseisudest kooslusetüübi kaupa värvitult. Iga punkt tähistab ühte proovi. Värvid tähistavad kooslusetüüpe: hall – alvar; must – kinnikasvanud alvar; oranž – õuemuru; lilla – puisniit; roheline – salumets; sinine – salumetsa raiesmik.



Joonis 11. Korrespondentsanalüüsi graafik, kus iga punkt tähistab ühe proovi AM seenekooslust. Punktid on värvitud selle järgi, kas tegemist on juureprooviga (punane) või mullaprooviga (sinine).

Kui kooslused jagada avatud ja metsasteks, ei ilmnenu korrespondentsanalüüsi pildil selgeid erinevusi, proovid olid ordinatsiooniruumis ühtlaselt jaotunud (Lisa 2).

Indikaatortaksonid

Mulla- ja juureproovide peale kokku tuvastati alvaril ja kinnikasvanud alvaril vastavalt kümme ja viis indikaatortaksonit (neist kaks olid indikaatoriks mõlemale kooslusetüübile), mida teistes kooslusetüüpides esines harvem või üldse mitte (kõik indikaatortaksonid sugukonnast *Glomeraceae*, tabel 2, indikaatorväärtus > 0,25). Õuemuru kooslusetüübile vastavaid indikaatortaksoneid oli viis (üks sugukonnast *Paraglomeraceae*, neli sugukonnast *Glomeraceae*). Salumetsa ja salumetsa raiesmiku indikaatortaksoneid oli

vastavalt kuus (kolm sugukonnast *Claroideglomeraceae*, üks *Acaulosporaceae*, üks *Archaeosporaceae*, üks *Paraglomeraceae*) ja kaks (sugukondadest *Glomeraceae* ja *Diversisporaceae*). Puisniidu kooslusetüübil indikaatortaksonid ei tuvastatud. Kokku tuvastati 26 virtuaaltaksonit, millel olid kooslusetüüpide suhtes statistiliselt olulised ning indikaatorväärtusega $> 0,25$.

Tabel 2. Indikaator-virtuaaltaksonid juure- ja mullaproovide peale kokku. “x” – taksoni indikaatorväärtus antud kooslusetüübis $> 0,25$; “o” – takson esines antud kooslusetüübis, kuid oli indikaatorväärtusega alla $0,25$.

VT	Sugukond	Liik	alvar	kk.alvar	muru	puisniit	salumets	raiesmik
VTX00129	Glomeraceae	Glomus sp.	x	x		o	o	o
VTX00153	Glomeraceae	Glomus sp.	x	x	o	o	o	
VTX00135	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o	o	o		o
VTX00166	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o	o	o	o	o
VTX00149	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o		o		o
VTX00117	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o		o		
VTX00156	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o		o		
VTX00123	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o				
VTX00304	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o	o			
new.otu_12	Glomeraceae	Glomus sp.	x					
VTX00072	Glomeraceae	Glomus sp.	o	x		o		o
VTX00371	Glomeraceae	Glomus sp.	o	x		o	o	
VTX00165	Glomeraceae	Glomus sp.		x				
VTX00193	Claroideglomeraceae	Claroideglomus lamellosum	o	o	o	o	x	o
VTX00057	Claroideglomeraceae	Claroideglomus sp.	o	o	o	o	x	o
VTX00056	Claroideglomeraceae	Claroideglomus sp.	o	o	o	o	x	o
VTX00030	Acaulosporaceae	Acaulospora sp.			o	o	x	o
VTX00005	Archaeosporaceae	Archaeospora sp.			o	o	x	
VTX00239	Paraglomeraceae	Paraglomus brasilianum			o		x	o
VTX00219	Glomeraceae	Glomus sp.	o		o		o	x
VTX00060	Diversisporaceae	Diversispora sp.				o		x
VTX00281	Paraglomeraceae	Paraglomus laccatum			x	o	o	o
VTX00074	Glomeraceae	Glomus sp.			x		o	o
VTX00191	Glomeraceae	Glomus sp.			x	o		o
VTX00108	Glomeraceae	Glomus sp.			x		o	
VTX00185	Glomeraceae	Glomus sp.			x			

Vaid juureproove vaadates eristusid indikaatortaksonitena 27 virtuaaltaksonit (indikaatorväärtus $> 0,25$, tabel 3). Enim indikaatortaksonid esines alvaritel ja kinnikasvanud alvaritel, vastavalt 11 ja neli, kõik sugukonnast *Glomeraceae*. Õuemuru indikaatoreiks olid 4 taksonit ja puisniidu indikaatoriks üks takson, kõik sugukonnast *Glomeraceae*. Salumetsa indikaatoreiks oli 6 taksonit (kolm sugukonnast *Claroideglomeraceae*, üks *Paraglomeraceae*, üks *Acaulosporaceae*, üks *Glomeraceae*) ning

salumetsa raiesmiku indikaatoreiks kaks taksonit, millest üks kattus salumetsa indikaatoriga (sugukonnad *Glomeraceae* ja *Claroideoglomeraceae*).

Tabel 3. Indikaatortaksonid juureproovides. "x" – taksoni indikaatorväärtus antud kooslusetüübis > 0,25; "o" – takson esines antud koosluse tüübis, kuid oli indikaatorväärtusega alla 0,25.

VT	Sugukond	Liik	alvar	kk.alv	muru	puis	salum	raiesm
VTX00113	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o	o	o	o	o
VTX00129	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o		o	o	o
VTX00135	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o				o
VTX00153	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o		o		
VTX00166	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o	o	o	o	o
VTX00371	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o		o		
VTX00149	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o		o		o
new.otu_9	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o		o		
VTX00117	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o		o		
VTX00156	Glomeraceae	Glomus sp.	x					
new.otu_12	Glomeraceae	Glomus sp.	x					
VTX00177	Glomeraceae	Glomus sp.		x				
VTX00165	Glomeraceae	Glomus sp.		x				
VTX00295	Glomeraceae	Glomus sp.	o	x	o	o	o	o
VTX00072	Glomeraceae	Glomus sp.	o	x		o		
VTX00057	Claroideoglomeraceae	Claroideglomus sp.	o	o	o	o	x	x
VTX00193	Claroideoglomeraceae	Claroideglomus lamellosum	o	o	o	o	x	o
VTX00056	Claroideoglomeraceae	Claroideglomus sp.		o	o	o	x	
VTX00281	Paraglomeraceae	Paraglomus laccatum			o		x	o
VTX00030	Acaulosporaceae	Acaulospora sp.			o	o	x	o
VTX00312	Glomeraceae	Glomus sp.					x	
VTX00219	Glomeraceae	Glomus sp.			o		o	x
VTX00074	Glomeraceae	Glomus sp.			x		o	o
VTX00191	Glomeraceae	Glomus sp.			x			o
VTX00108	Glomeraceae	Glomus sp.			x		o	
VTX00111	Glomeraceae	Glomus sp.	o		x		o	o
VTX00115	Glomeraceae	Glomus sp.	o	o	o	x	o	o

Kaasates analüüsi vaid mullaproove, eristusid indikaatortaksonitena 39 virtuaaltaksonit (indikaatorväärtus > 0,25, tabel 4). Enim indikaatoreid esines alvar – kinnikasvanud alvar paaril (16 virtuaaltaksonit, millest 7 kattusid; sugukonnaline kuuluvus 15 *Glomeraceae*, 1 *Archaeosporaceae*). Öuemuru indikaatortaksoneid oli 8, sugukondadest *Glomeraceae*, *Acaulosporaceae*, *Paraglomeraceae*, *Archaeosporaceae*. Puisniidul tuvastati 4 indikaator-virtuaaltaksonit sugukondadest *Claroideoglomeraceae*, *Glomeraceae*, *Diversisporaceae*.

Tabel 4. Indikaatortaksonid mullaproovides. “x” – taksoni indikaatorväärtus antud kooslusetüübis > 0,25; “o” – takson esines antud koosluse tüübis, kuid oli indikaatorväärtusega alla 0,25.

VT	Sugukond	Liik	alvar	kk.alv	muru	puis	salum	raiesm
VTX00371	Glomeraceae	Glomus sp.	x	x		o	o	
VTX00149	Glomeraceae	Glomus sp.	x	x		o		o
VTX00202	Glomeraceae	Glomus sp.	x	x				
VTX00129	Glomeraceae	Glomus sp.	x	x		o	o	o
VTX00135	Glomeraceae	Glomus sp.	x	x	o	o		o
VTX00153	Glomeraceae	Glomus sp.	x	x	o	o	o	
VTX00064	Glomeraceae	Glomus sp.	x	x	o	o	o	o
VTX00117	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o		o		
VTX00156	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o		o		
VTX00123	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o				
VTX00304	Glomeraceae	Glomus sp.	x	o	o			
new.otu_12	Glomeraceae	Glomus sp.	x					
VTX00072	Glomeraceae	Glomus sp.	o	x		o		o
VTX00373	Glomeraceae	Glomus sp.	o	x		o		
VTX00338	Archaeosporaceae	Archaeospora sp.	o	x		o		o
VTX00165	Glomeraceae	Glomus sp.		x				
VTX00115	Glomeraceae	Glomus sp.	o	o	o	o		x
VTX00219	Glomeraceae	Glomus sp.	o		o		o	x
VTX00067	Glomeraceae	Glomus mosseae		o		o	o	x
VTX00060	Diversisporaceae	Diversispora sp.				o		x
VTX00356	Diversisporaceae	Diversispora sp.		o				x
VTX00057	Claroideglomeraceae	Claroideglomus sp.	o	o	o	o	x	o
VTX00056	Claroideglomeraceae	Claroideglomus sp.	o	o	o	o	x	o
VTX00239	Paraglomeraceae	Paraglomus brasilianum			o		x	o
VTX00125	Glomeraceae	Glomus sp.	o		o		x	o
VTX00049	Gigasporaceae	Scutellospora sp.			o		x	
VTX00284	Pacisporaceae	Pacispora scintillans					x	
VTX00193	Claroideglomeraceae	Claroideglomus lamellosum	o	o	o	x	x	o
VTX00113	Glomeraceae	Glomus sp.	o	o	o	x	o	o
VTX00295	Glomeraceae	Glomus sp.	o	o		x		o
VTX00263	Diversisporaceae	Diversispora spurca	o	o	o	x	o	o
VTX00030	Acaulosporaceae	Acaulospora sp.			x	o	x	o
VTX00005	Archaeosporaceae	Archaeospora sp.			x	o	x	
VTX00281	Paraglomeraceae	Paraglomus laccatum			x	o	o	o
VTX00074	Glomeraceae	Glomus sp.			x		o	o
VTX00191	Glomeraceae	Glomus sp.			x	o		o
VTX00108	Glomeraceae	Glomus sp.			x		o	
VTX00231	Acaulosporaceae	Acaulospora sp.			x	o	o	
VTX00185	Glomeraceae	Glomus sp.			x			

Salumetsa ja salumetsa raiesmiku indikaatortaksonitest ei kattunud mullaproovide puhul ükski. Salumetsa indikaatortaksoneid tuvastati 9, sugukondadest *Claroideoglomeraceae*, *Paraglomeraceae*, *Glomeraceae*, *Gigasporaceae*, *Pacisporaceae*, *Acaulosporaceae*, *Archaeosporaceae*. Salumetsa raiesmikul tuvastas analüüs 5 indikaator-virtuaaltaksonit, sugukondadest *Glomeraceae* ja *Diversisporaceae*.

Arutelu

Töö tulemusena sai kinnitust, et AM seenekooslused erinevad taimekooslusetüüpide vahel nii proovipõhise VT arvu poolest kui ka koosluse koosseisu poolest. Ka leiti, et AM seente kooslused juurtes ning juuri ümbritsevas mullas erinevad nii koosseisult kui virtuaaltaksonite arvu ja sekventsides arvu poolest. AM seenekoosluste erinevusi toetas ka indikaatorliikide analüüs nii mulla ning juureproovide vaheliste erinevustega kui ka erinevustega kooslusetüüpide vahel. Kõige liigirikkamaks kooslusetüübiks osutus antud koosluste võrdluses õuemuru.

AM seente virtuaaltaksonite arv

VT arv proovi kohta oli kõrgem avatud kooslustes. Sarnaseid tulemusi on saanud Moora et al. (2014), kuigi proovist tuvastatud VT arv oli viidatud töös mõnevõrra madalam. Samuti oli käesolevas töös juuri ümbritsevast mullast leitud AM seente taksonite arv proovi kohta tunduvalt kõrgem, kui juurtes leidunud AM seente koosluste virtuaaltaksonite arv proovi kohta. Erinevus VT arvus ilmnes ka kitsamate kooslusetüüpide võrdluses, kus võis näha trendi, et VT arv proovi kohta langes koosluse metsasuse astme kasvades. Juureproove ja mullaproove eraldi vaadates oli VT arvu languse kõver laugem mullaproovide puhul ning langes metsasuse ilmnedes järsemini juureproovide puhul. Sellisest erinevusest johtuvalt võiks spekuloida, et liigiga *P. vulgaris* on mingil põhjusel metsasemates kasvukohtades proovipõhiselt seotud väiksem arv AM seente taksonideid, samas kui ümbritsevas mullas saadaval olevate AM seente taksonite arv ei pruugi olla veel samavõrra väiksem.

Kogu VT arv mullas oli kõrgem kui juurtes, kusjuures enamik juurtest leitud virtuaaltaksonideid olid esindatud ka mullaproovides. See tulemus erineb mõnedest eelnevatest tulemustest, kus juureproovidest leitud VT arv on olnud enam-vähem sama või suurem kui mullaproovides (Busby et al. 2013; Saks et al. 2014). Erinevuste põhjus võib olla asjaolu, et käesolevas töös kasutati mullast DNA eraldamisel suhteliselt suurt kogust (5g) mulda, mis tagab suurema tõenäosuse mingi virtuaaltaksoni "üles leida" (muudes töödes on üldjuhul mullaproovi suurus olnud <1 g). See, miks mõnesid juurtes esinenud virtuaaltaksonideid mullaproovidest ei tuvastatud, võib olla tingitud AM seente

allokatsioonilistest erinevustest juuresisestesse ja juurevälistesse struktuuridesse (Hart & Reader 2002), kusjuures just *Glomeraceae* sugukonna esindajad allokeerivad biomassi pigem juuresisestesse struktuuridesse, mis nähtus ka käesolevas töös, kus sugukonna *Glomeraceae* esindajad olid juureproovides suuremas ülekaalus kui mullaproovides. Samuti võib see asjaolu olla samuti tingitud sellest, et mullaproovides olev AM sekventsides tihedus on väiksem, nii et isegi suhteliselt suure proovi puhul mingile virtuaaltaksonile “pihta saamise” võimalus on ikkagi väike (Lumini et al. 2010).

Metsastes kooslusetüüpides esinenud suhteliselt madalam VT arv proovi kohta võrreldes avatud kooslusetüüpidega on ilmnenu ka eelnevates töödes (Öpik et al. 2006; Moora et al. 2014). Seda on seletatud näiteks ka salumetsas leiduva kuuse mõjuga pealmise mullakihi pH-le, samuti on näidatud, et ektomükoriissed puud võivad suruda alla AM seente liigirikkust mullas ning pärssida AM seente kolonisatsiooni juurtes (Tyndall 2005; Becklin et al. 2012). Mulla AM seente liigirikkuse pärssimist ektomükoriisete puude poolt kinnitab ka antud katses ilmnenu madalam VT sekventsides arv salumetsas võrreldes salumetsa raiesmikuga. Kuivõrd raiesmikud olid suhteliselt noored (raiutud hinnanguliselt viimase kolme aasta jooksul), võib spekuloida, et ektomükoriisete puude eemaldamisel paraneb AM seente olukord kiiresti ja märgatavalt. Arbuskulaarmükoriisse hariliku kadaka poolt kinnikasvanud alvaril oli vaatamata alustaimestiku vaesumisele siiski AM seente liigirikkus mullas oluliselt kõrgem kui salumetsas.

AM seenekoosluste koosseis

Kui varasemates töödes (Öpik et al. 2006; Kivlin et al. 2011; Moora et al. 2014) on leitud erinevusi AM seenekoosluste koosseisus avatud ja metsaste koosluste vahel, siis antud töös ordinatsioonipildilt selgeid erinevusi ei tuvastatud. Samas peegeldasid erinevate kooslusetüüpide erinevusi nii ordinatsioonanalüüs kui indikaatorliikide analüüs, kus näiteks muudest sugukondadest peale *Glomeraceae* pärit indikaatortaksonid esinesid juurtes vaid salumetsa proovides, mullaproovide indikaatortaksoniteks olid seevastu muude sugukondade esindajad ka teistes kooslusetüüpides. Sarnaseid tulemusi, mis toetavad hüpoteesi AM seeneliikide erinevatest nišieelistustest, on saanud näiteks ka Varela-Cervero et al. (2015). Seda, miks vaid salumetsas esines juurtes muude sugukondade esindajaid, kuigi mullas võisid muud sugukonnad olla arvukalt esindatud ka

teistes kasvukohtades, võiks tõlgendada kui taim-seen vastastikuste eelistuste muutust kasvukohast tulenevalt. Samalaadseid tulemusi on saanud ka Davison et al. (2011), kus leiti, et ühe peremeestaimeliigi juuri koloniseerisid erinevates kooslusetüüpides (erineva maakasutuse korral) eelistatult erinevad AM seente liigid. Kuivõrd on näidatud, et AM seente funktsionaalsed ja elukäigutunnused võivad olla fülogeneetiliselt konserveerunud (Hart & Reader 2002; Chagnon et al. 2013), võib oletada, et kasvukohtadevahelised erinevused juurte AM seente kooslustes peegeldavad vastavates kasvukohtades eelistatud erinevaid mükoriisaseente funktsionaalseid omadusi. Sams erinesid koosluste vahel ka mullas olevad AM seenekooslused, mistõttu juurtele kättesaadavad AM seeneliigid ei pruugi erinevate kooslusetüüpide vahel olla samad. Indikaatorliikide analüüse võrreldes johtub aga jällegi, et mulla AM seenekooslused on fülogeneetiliselt hajusamad kui juurte AM seenekooslused, mis mõneti toetab eelmainitud fülogeneetiliselt konserveerunud erinevate funktsionaalsete tunnuste eelisseisu mingites kindlates kooslusetüüpides.

Küll aga erinesid selgelt mullas ning juurtes esinevad AM seente kooslused, seda nii ordinatsioonipildil kui ka indikaatortaksonite analüüsil. Mullaproovide fülogeneetiliselt varieeruvam indikaator-virtuaaltaksonite koosseis annab alust spekulatsioonidele teatud AM seente fülogeneetiliste rühmade parema konkurentsivõime üle juuri koloniseerides. AM seente vahelist konkurentsi on uuritud suhteliselt vähe (Wilson 1984; Hepper et al. 1988; Jansa et al. 2008). Tihtipeale ka teistes katsetes tugevat konkurentsivõimet ilmutavad perekonna *Glomus* esindajad domineerisid indikaatorliikide analüüsis juureproovides, samas kui mullaproovide indikaator-virtuaaltaksonite seas oli hulganisti esindajaid ka teistest perekondadest ja sugukondadest. Samuti võib siinkohal olla tegu sellega, et muld on kui seeneliikide fond, kust juuri koloniseerivad seened moodustavad sellest teatud alaosa (Johnson et al. 2003; Davison et al. 2011), liiki *P. vulgaris* proovivõtu hetkel mitteasustavad AM seened võivad potentsiaalselt asustada teisi koosluses olemasolevaid taimeliike.

Kui arvesse võtta taimekoosluste subjektiivset kvaliteeti (häirituse tugevus, traditsiooniliselt "heaks" koosluseks peetavast erinevine – kinnikasvamine, liigne inimõju), ei ilmnenud ordinatsioonidel suuri erinevusi. See on erinev näiteks Moora et al. (2014) tulemustest, kus kvaliteeti iseloomustavaks parameetriks oli koosluse häirituse

aste. Miks antud töös koosluse kvaliteedil AM seenekooslustele mõju ei ilmnenud, võib tuleneda sellest, et kvaliteedi näitajaks ei olnud mitte niivõrd häiringu intensiivsus (kui välja arvata raiesmiku mehaaniline häiring), vaid pigem gradient “traditsioonilise” ja sellest aspektist oma ilme kaotanud ning vaesunud koosluste vahel. Selline häiring on suhteliselt väike ja oodatav muutus AM seenekooslusele samuti.

Tänuavaldused

Soovin väga tänada oma juhendajat Maarja Öpikut heade nõuannete ning pika kannatuse eest. Samuti tänan oma tööühmakaaslasi – Teele Jairus, Ülle Saks, Martti Vasar, David García de León, Guillermo Bueno –, kes aitasid töö valmimisele kaasa nii laboris kui arvutiekraani taga. Veel tänan Anu Lepikut igakülgse abi eest nii välitöödel kui ka mujal.

Uurimisprojekti rahastas Eesti Teadusagentuur (IUT20-28) ja Euroopa Regionaalarengu Fond (Tartu Ülikooli Bioloogilise mitmekesisuse tippkeskus FIBIR).

Kasutatud kirjandus

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.

Becklin, K.M., Pallo, M.L., & Galen, C. 2012. Willows indirectly reduce arbuscular mycorrhizal fungal colonization in understory communities. *Journal of Ecology* 100: 343–351.

Bik, H.M., Porazinska, D.L., Creer, S., Caporaso, J.G., Knight, R., & Thomas, W.K. 2012. Sequencing our way towards understanding global eukaryotic biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* 27: 233–243.

Brito, I., Goss, M.J., de Carvalho, M., Chatagnier, O., & van Tuinen, D. 2012. Impact of tillage system on arbuscular mycorrhiza fungal communities in the soil under Mediterranean conditions. *Soil and Tillage Research* 121: 63–67.

Busby, R.R., Stromberger, M.E., Rodriguez, G., Gebhart, D.L., & Paschke, M.W. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungal community differs between a coexisting native shrub and introduced annual grass. *Mycorrhiza* 23: 129–141.

Chagnon, P.-L., Bradley, R.L., Maherali, H., & Klironomos, J.N. 2013. A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. *Trends in Plant Science* 18: 484–91.

Davison, J., Öpik, M., Daniell, T.J., Moora, M., & Zobel, M. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in plant roots are not random assemblages. *FEMS Microbiology Ecology* 78: 103–15.

Dondoshansky, I., & Wolf, Y. 2000. BLASTCLUST-BLAST score-based single-linkage clustering. *NCBI, Bethesda*.

Drigo, B., Pijl, A., & Duyts, H. 2010. Shifting carbon flow from roots into associated microbial communities in response to elevated atmospheric CO₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 107: 10938–10942.

- Dufrêne, M., & Legendre, P. 1997. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs* 67: 345–366.
- Dumbrell, A.J., Nelson, M., Helgason, T., Dytham, C., & Fitter, A.H. 2010. Relative roles of niche and neutral processes in structuring a soil microbial community. *The ISME Journal* 4: 337–45.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., & Knight, R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194–2200.
- Hart, M., & Klironomos, J. 2003. Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Ecosystem Functioning. In van der Heijden, M.A. & Sanders, I. (eds.), *Mycorrhizal Ecology*, pp. 225–242. Springer Berlin Heidelberg.
- Hart, M.M., & Reader, R.J. 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 153: 335–344.
- Van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R., & van Straalen, N.M. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11: 296–310.
- Van der Heijden, M.G.A., Boller, T., Wiemken, A., & Sanders, I.R. 1998. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* 79: 2082–2091.
- Helgason, T., Merryweather, J.W., Denison, J., Wilson, P., Young, J.P.W., & Fitter, A.H. 2002. Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology* 90: 371–384.
- Hepper, C.M., Azcon-Aguilar, C., Rosendahl, S., & Sen, R. 1988. Competition between three species of *Glomus* used as spatially separated introduced and indigenous mycorrhizal inocula for leek (*Allium porrum* L.). *New Phytologist* 110: 207–215.
- Jansa, J., Smith, F.A., & Smith, S.E. 2008. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New phytologist* 177: 779–89.

- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., & Barea, J.M. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils* 37: 1–16.
- Johnson, N.C., Rowland, D.L., Corkidi, L., Egerton-Warburton, L.M., & Allen, E.B. 2003. Nitrogen enrichment alters mycorrhizal allocation at five mesic to semiarid grasslands. *Ecology* 84: 1895–1908.
- Kivlin, S.N., Hawkes, C. V., & Treseder, K.K. 2011. Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 2294–2303.
- Lee, J., Lee, S., & Young, J.P.W. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 339–349.
- Li, L.-F., Li, T., Zhang, Y., & Zhao, Z.-W. 2010. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their distribution patterns related to host-plants and habitats in a hot and arid ecosystem, southwest China. *FEMS Microbiology Ecology* 71: 418–427.
- López-García, Á., Palenzuela, J., Barea, J., & Azcón-Aguilar, C. 2014. Life-history strategies of arbuscular mycorrhizal fungi determine succession into roots of *Rosmarinus officinalis* L., a characteristic woody perennial plant species from Mediterranean ecosystems. *Plant and Soil* 379: 247–260.
- Lumini, E., Orgiazzi, A., Borriello, R., Bonfante, P., & Bianciotto, V. 2010. Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. *Environmental Microbiology* 12: 2165–2179.
- Miller, R.M., & Jastrow, J.D. 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure. In Koltai, H. & Kapulnik, Y. (eds.) *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*, pp. 3–18. Springer Netherlands, Dodrecht.
- Milne, I., Lindner, D., Bayer, M., Husmeier, D., McGuire, G., Marshall, D.F., & Wright, F. 2009. TOPALi v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops. *Bioinformatics* 25: 126–127.

- Mirás-Avalos, J.M., Antunes, P.M., Koch, A., Khosla, K., Klironomos, J.N., & Dunfield, K.E. 2011. The influence of tillage on the structure of rhizosphere and root-associated arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Pedobiologia* 54: 235–241.
- Moora, M., Davison, J., & Öpik, M. 2014. Anthropogenic land use shapes the composition and phylogenetic structure of soil arbuscular mycorrhizal fungal communities. *FEMS Microbiology Ecology* 90: 609–21.
- Oehl, F., Laczko, E., Bogenrieder, A., Stahr, K., Bösch, R., van der Heijden, M., & Sieverding, E. 2010. Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 724–738.
- Oehl, F., Sieverding, E., & Ineichen, K. 2003. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2816–2824.
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O’Hara, B., Stevens, M.H.H., Oksanen, M.J., & Suggests, M. 2015. The vegan package. *R package version 2.2.1*.
- Öpik, M., Davison, J., Moora, M., & Zobel, M. 2014. DNA-based detection and identification of Glomeromycota : the virtual taxonomy of environmental sequences. *Botany* 92: 135–147.
- Öpik, M., Moora, M., Liira, J., & Zobel, M. 2006. Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94: 778–790.
- Öpik, M., Vanatoa, A., & Vanatoa, E. 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist* 188: 223–41.
- Öpik, M., Zobel, M., Cantero, J.J., Davison, J., Facelli, J.M., Hiiesalu, I., Jairus, T., Kalwij, J.M., Koorem, K., Leal, M.E., Liira, J., Metsis, M., Neshataeva, V., Paal, J., Phosri, C., Põlme, S., Reier, Ü., Saks, Ü., Schimann, H., Thiéry, O., Vasar, M., & Moora, M. 2013. Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 23: 411–30.

- Parameswaran, P., Jalili, R., Tao, L., Shokralla, S., Gharizadeh, B., Ronaghi, M., & Fire, A.Z. 2007. A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils opportunities for large-scale sample multiplexing. *Nucleic acids research* 35: e130.
- Roberts, D.W. 2013. labdsv: Ordination and multivariate analysis for Ecology. *R package version 1.6.1* 1.:
- Saks, Ü., Davison, J., Öpik, M., Vasar, M., Moora, M., & Zobel, M. 2014. Root-colonizing and soil-borne communities of arbuscular mycorrhizal fungi in a temperate forest understorey. *NRC Research Press* 285: 277–285.
- Simon, L., Lalonde, M., & Bruns, T.D. 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 291–295.
- Smith, S.E., & Read, D.J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, Oxford.
- R Core Team 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012.
- Tyndall, R.W. 2005. Twelve years of herbaceous vegetation change in oak savanna habitat on a Maryland serpentine barren after Virginia pine removal. *Castanea* 70: 287–297
- Uibopuu, A., Moora, M., Öpik, M., & Zobel, M. 2012. Temperate forest understorey species performance is altered by local arbuscular mycorrhizal fungal communities from stands of different successional stages. *Plant and Soil* 356: 331–339.
- Varela-Cervero, S., Vasar, M., Davison, J., Barea, J.M., Öpik, M., & Azcón-Aguilar, C. 2015. The composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities differs among the roots, spores and extraradical mycelia associated with five Mediterranean plant species. *Environmental Microbiology*. doi: 10.1111/1462-2920.12810
- Willis, A., Rodrigues, B.F., & Harris, P.J.C. 2013. The ecology of arbuscular mycorrhizal Fungi. *Critical Reviews in Plant Sciences* 32: 1–20.
- Wilson, J. 1984. Competition for infection between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 97: 427–435.

Zobel, M., & Öpik, M. 2014. Plant and arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities— which drives which? *Journal of Vegetation Science* 25: 1133–1140.

Kokkuvõte

Arbuskulaarmükoriisete (AM) seente ja maismaataimede vaheline kooselu on kõige laiemalt levinud sümbioosi vorm Maal. Vastutasuks taimede poolt fikseeritud süsinikule parandavad AM seened taimede toitainetega varustatust, stressitaluvust ning pakuvad kaitset patogeenide vastu. Samuti parandavad AM seened mulla struktuuri.

Erinevused AM seente kooslustes võivad väljenduda AM seente mõjus taimekoosluste kujunemisele ja produktiivsusele, samuti muudes ökosüsteemi näitajates nagu mullas truktuur ning süsiniku- ja lämmastikuvaru. Selleks, et mõista AM seente rolli taimkatte kujunemisel, on vaja uurida tegureid, mis AM seenekooslusi mõjutavad.

Käesoleva töö eesmärk oli uurida AM seenekoosluste erinevusi maakasutuse poolest erinevates kooslusetüüpides (alvar, kinnikasvanud alvar, puisniit, õuemuru, salumets, salumetsa raiesmik). AM seenekooslusi uuriti ühe taimeliigi (*Prunella vulgaris*) juurtes ning selle taimeliigi juuri ümbritsevas mullas. Töös sooviti vastust leida järgmistele küsimustele: (1) kas AM seente mitmekesisus sõltub kooslusetüübist; (2) kas ja kuidas kuidas erinevad kooslusetüüpide AM seenekoosluste koosseisud; (3) kas AM seente mitmekesisus ja koosluse koosseis erineb juurtes ja juuri ümbritsevas mullas?

Proovidest 454 sekveneerimise tulemusel tuvastatud AM seenekoosluste analüüsi tulemusel leiti, et AM seente proovipõhine virtuaaltaksonite (VT – DNA järjestuste sarnasuse alusel loodud AM seente liigi tasemel taksonid) arv erineb kooslusetüüpide vahel, kusjuures VT arv proovis oli madalaim salumetsas ning umbkaudu poole võrra kõrgem alvaril. Kooslusetüüpide erinevus ilmnis ka AM seenekoosluste koosseisude ordinatsioonil, kus omavahel grupeerusid alvari ja kinnikasvanud alvari AM seenekooslused, mis eristusid salumetsa, salumetsa raiesmiku ja õuemuru AM seenekooslustest. Kooslusetüüpidest enim esines virtuaaltaksoneid õuemurus (84) ja vähim kinnikasvanud alvaril (56).

AM seenekooslused erinesid juurtes ja mullas nii proovipõhise VT arvu poolest (keskmiselt rohkem VT esines mullaproovides) kui ka koosluse koosseisu poolest, kus mulla- ja juureproovid ordinatsioonil selgelt eristusid. Indikaatortaksonite analüüs näitas,

et mullaproovide AM seenekooslused sisaldavad laiemat valikut sugukondi üle AM seente fülogeneesipuu kui juureproovid.

Tulemustest võib järeldada, et kooslusetüüpide vahel ei erine mitte ainult maapealsed kooslused, vaid kooslusi uurides tuleb arvestada ka erinevustega maa-aluses mitmekesisuses.

Summary

Impact of land use on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi

The symbiosis between arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and land plants is the most widespread form of mutualistic coexistence on land. In exchange for received photosynthetically fixed carbon, AM fungi deliver nutrients to plants, alleviate stress and provide protection against pathogens.

Differences in AM fungal communities may result in their different effects on the formation and productivity of plant communities, and other ecosystem-related properties such as soil structure and carbon storage.

The aim of the current dissertation was to investigate differences in AM fungal richness and community composition between different habitat types (alvar calcareous grasslands, overgrown alvars, wooded meadows, lawns, boreonemoral mixed forests and clearcut sites of those forests). The AM fungal communities were investigated from root samples of a single plant species (*Prunella vulgaris*) and its rhizosphere soil. The following questions were asked: (1) is AM fungal richness dependent on habitat type; (2) whether and how AM fungal communities differ between habitat types; (3) is AM fungal richness and community composition different between root and soil samples?

We found that AM fungal richness per sample was indeed different between habitat types, the highest being in alvar grasslands and the lowest in boreo-nemoral mixed forests (about 2/3 of taxa count per sample of alvars). Habitat types differed in terms of their AM fungal community compositions as well, as alvars and overgrown alvars were clearly distinct from lawns, boreonemoral mixed forests and clearcut sites on ordination plots. The most virtual taxa (VT - sequence groups delimited on the basis of sequence similarity) per habitat were found in lawns (84) and the least in overgrown alvars (56).

AM fungal communities in soil and roots were also different based on AM fungal taxon richness and community composition, which was apparent in both ordination analyses and indicator species analyses.

The results suggest, that in addition to aboveground diversity, belowground diversity also responds to habitat changes.

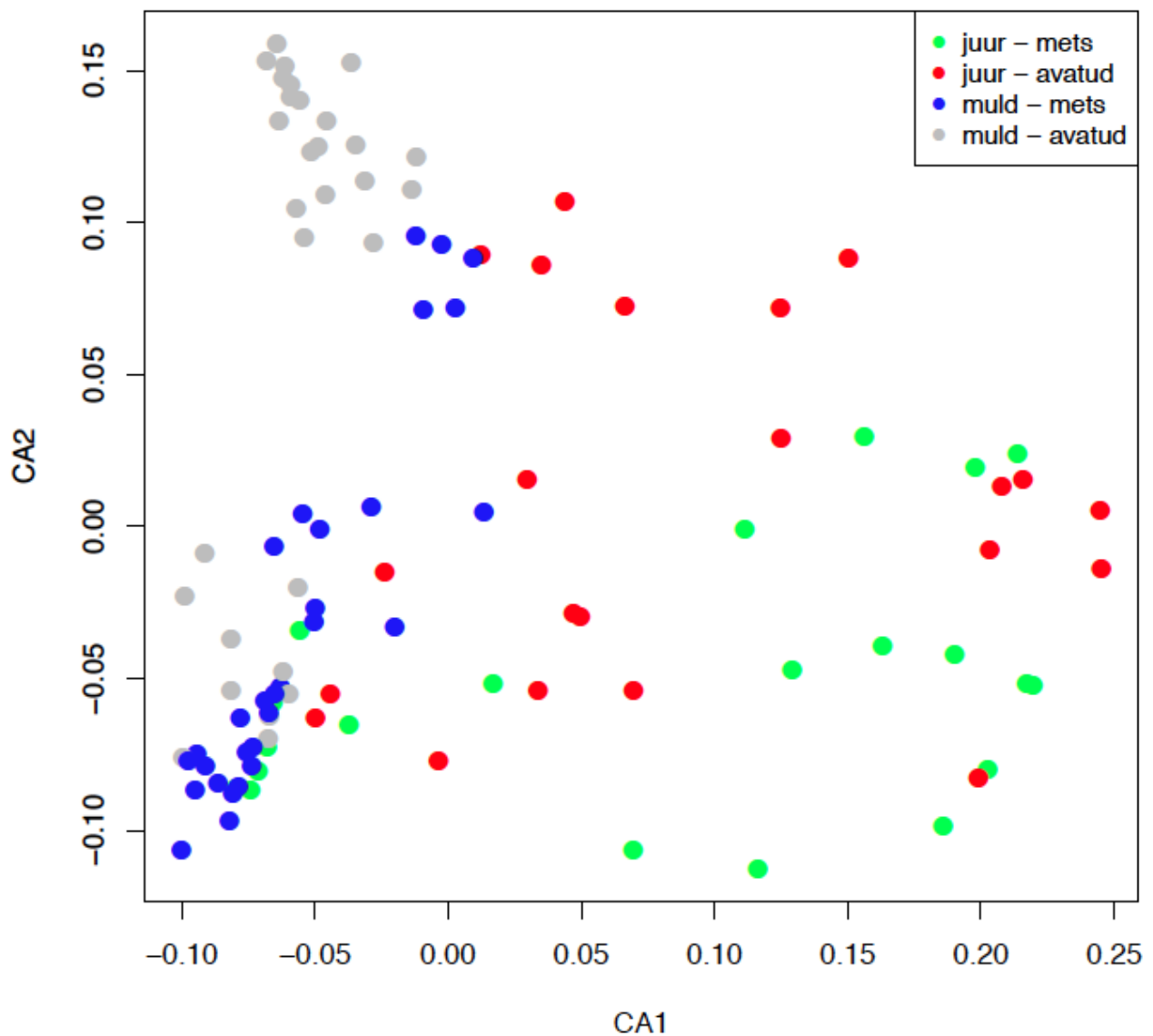
Lisad

Lisa 1.

Proovialade tabel proovialade asukohtade, proovivõtu kuupäeva, sekveneerimisel töötanud proovide arvu, *Glomeromycota* sekventsideside arvu ja AM virtuaaltaksonite (VT) arvuga prooviala kohta.

Kasvukoht	Asukoht	Koordinaadid	Proovivõtu kuupäev	Töötavaid juureproove	Töötavaid mullaproove	<i>Glomeromycota</i> sekventsideside arv	VT arv
Alvar 1	Lõu	58° 06' 15" N 22° 11' 16" E	28.07.2014	4	5	12644	44
Alvar 2	Uisu	58° 38' 31" N 23° 30' 55" E	11.08.2014	3	5	9553	52
Kinnikasvanud alvar 1	Ridala	58° 26' 12" N 23° 04' 16" E	29.07.2014	2	5	6042	40
Kinnikasvanud alvar 2	Uisu	58° 38' 33" N 23° 30' 54" E	11.08.2014	4	5	12603	48
Puisniit 1	Nedrema	58° 32' 33" N 24° 04' 30" E	11.08.2014	4	5	10866	49
Puisniit 2	Tagamõisa	58° 27' 40" N 21° 59' 58" E	28.07.2014	3	5	6775	41
Õuemuru 1	Tummelka	57° 40' 38" N 27° 07' 09" E	06.08.2014	4	5	11375	57
Õuemuru 2	Voorbahi	58° 03' 11" N 25° 51' 40" E	06.08.2014	5	5	15455	58
Salumetsa raiesmik 1	Ao	58° 14' 14" N 26° 10' 02" E	12.08.2014	3	5	8727	32
Salumetsa raiesmik 2	Vahuküla	58° 58' 19" N 26° 07' 31" E	07.08.2014	4	5	19485	50
Salumets 1	Koeru	58° 58' 34" N 26° 02' 42" E	07.08.2014	4	5	5813	42
Salumets 2	Vapramäe	58° 15' 05" N 26° 27' 37" E	06.08.2014	3	5	8382	43

Lisa 2.



Lisa 1. Korrespondentsanalüüs AM seenekoosluse koosseisudest kooslusetüübi avatuse ja proovitüübi põhjal jagatuna. Värvid tähistavad proovide jaotust koosluse avatuse ning proovitüübi põhjal: Roheline – metsase koosluse juureproovid; punane – avatud koosluse juureproovid; sinine – metsase koosluse mullaproovid; hall – avatud koosluse mullaproovid.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Siim-Kaarel Sepp,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

MAAKASUTUSE MÕJU ARBUSKULAARMÜKORIISSETE (AM) SEENTE MITMEKESISUSELE,

mille juhendaja on Maarja Öpik,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **28.05.2015**